Einfluß von Phytohämagglutinin auf den Virusübertritt aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

EWALT SCHERER

aus Kaiserslautern

1968

9809

Einfluß von Phytohämagglutinin auf den Virusübertritt aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

EWALT SCHERER

aus Kaiserslautern

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 7. November 1968

Dekan: Prof. Dr. H. Blume

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Friedrich-Freksa

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zähner

Herrn Professor Dr.Friedrich-Freksa
bin ich zu großem Dank verpflichtet
für die Förderung und das rege
Interesse an dieser Arbeit.
Herrn Dr.k.köhler danke ich für
kritische Diskussionen, Herrn
Dr.W.Vielmetter für seine Einführung
in die Arbeit mit Bakteriophagen.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Problemstellung 4

Material und Methoden 11

1. Versuchstiere 11
2. Entnahme von Blutproben, Spülung der Bauchhöhle 11
3. FRIEND-Leukämievirus (FLV) 12
4. FLV-Titration 13
5. Bakteriophage T_4 13
6. T_4-Titration 14
7. Test auf neutralisierende Antikörper 15
8. Reagentien 16
9. Fehlerrechnung 16

Ergebnisse 17

Teil I: Suppression der FLV-Erkrankung durch Vorbehandlung mit PHA 17

1. Abhängigkeit der Suppression der FLV-Erkrankung von der Dosis der PHA-Vorbehandlung 17
2. Abhängigkeit von der Zeit zwischen PHA- und FLV-Injektion 20
3. Wirkung einer intraperitonealen PHA-Vorbehandlung auf intravenöse FLV-Infektion 22
4. Übergang von FLV aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf 22

Teil II: Suppression des Virusübertrittes (T_4-Phage) aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA 25

1. Abhängigkeit der Suppression des Virusübertrittes von der Dosis der PHA-Vorbehandlung 26
2. Abhängigkeit der Suppression des Virusübertrittes von der Zeit zwischen PHA- und T_4-Injektion 27
3. Prüfung der Spezifität der PHA-Wirkung 29

4. Berechnungen zum Virusübertritt 30
5. Prüfung der Annahmen für die Berechnung von C_2 auf ihre Gültigkeit, Messung der Parameter k_1 und k_2 33
Teil III: Immunosuppression durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA 44
1. Abhängigkeit der Immunreaktion auf intraperitoneal und intravenös injizierte T_4-Phagen von der PHA-Vorbehandlung 44
2. Abhängigkeit der Immunreaktion von der Dosis der PHA-Vorbehandlung 48
3. Abhängigkeit der Immunosuppression von der Zeit zwischen PHA- und T_4-Injektion 49
Diskussion 51
Zusammenfassung 54
Literaturverzeichnis 55

Einleitung und Problemstellung

Den Ausgangspunkt zur vorliegenden Arbeit bildeten Untersuchungen, die den Infektionsverlauf des Friend-Mäuseleukämievirus (FLV) klären sollten. Hierbei fand ich, daß die durch die Infektion mit FLV bedingte Erkrankung durch eine geeignete Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phytohämagglutinin (PHA) stark gehemmt wurde. Dieser Befund ließ sich mit den Vorstellungen von der FLV-Erkrankung bzw. von der Wirkungsweise des PHA nicht erklären; die damit aufgeworfene Fragestellung wurde weiter verfolgt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in dieser Arbeit niedergelegt.

Das Friend-Virus wurde 1956 von Ch. FRIEND[1] aus einer leukämischen Maus isoliert. Es besteht aus einer äußeren, lipidhaltigen Hülle von ca. 100 m/u Durchmesser und einem von dieser umschlossenen Kapsid komplexer Struktur[2,3,4]. Im Kapsid ist eine Einstrang RNS enthalten, die mit einer Sedimentationskonstanten $S_{20,w}$ = 74 sedimentiert[5]. Die systematische Stellung der Mäuseleukämieviren (es wurden u.a. von RAUSCHER[6], GROSS[7] und MOLONEY[8] weitere Mäuseleukämieviren isoliert) im Rahmen der großen, lipidhaltigen RNS-Viren, zu denen auch die Myxoviren und die Hühnerleukoseviren gehören, ist noch ungeklärt. Das FLV ist wie das sehr ähnliche RAUSCHER-Virus auf erwachsene Mäuse übertragbar; Serum oder Milzhomogenat erkrankter Tiere können als Virusquelle dienen. Die Erkrankung entwickelt

sich sehr schnell. Erste nachweisbare Veränderungen der Milz treten 3 Tage nach der Infektion auf. Zu dieser Zeit lassen sich in Hämalaun-gefärbten Schnittpräparaten in der roten Pulpa der Milz Zellbezirke von ca. 100 Zellen finden, die in der normalen Milz nicht vorkommen und die sich von der Umgebung durch ihre einheitliche Besiedelung mit größeren, plasmareichen und leicht basophilen Zellen unterscheiden. Die Teilungsrate ist in ihnen sehr hoch. Diese Bezirke wachsen in weiteren drei Tagen zu Zellkolonien heran, die nach Fixierung der Milz mit bloßem Auge erkennbar sind. Die Zahl dieser Milzkolonien kann als Maß für die Stärke der Infektion dienen[9,10]. Die weitere Erkrankung ist durch eine massive Milzvergrößerung (bis über 2 g, gegenüber normalem Milzgewicht von ca. 0,1 g), die durch Wucherung der Primärkolonien und durch Sekundärinfektion durch neugebildetes Virus bedingt ist, und durch eine starke Vermehrung der Leukozyten im peripheren Blut gekennzeichnet. Die Erkrankung führt im Laufe von 2-3 Monaten bei allen infizierten Tieren zum Tode.

Phytohämagglutinin ist ein aus Samen der Bohne Phaseolus vulgaris L. extrahiertes Lectin[12,13] (über Lectine s.eine Zusammenstellung von BOYD, 1963[14]), dessen Eigenschaft, Erythrozyten verschiedener Tiere zu agglutinieren, schon länger bekannt ist[12,15]. Die starke Beachtung, die PHA heute genießt, geht auf eine andere Eigenschaft zurück: 1960 fand NOWELL[16], daß PHA das Wachstum der peripheren Lymphozyten des Menschen in Zellkultur stimuliert. Die kleinen Lymphozyten - lange Zeit als die nicht mehr teilungsfähige Endstufe einer Differenzie-

rungsreihe angesehen - gehen unter dem Einfluß von PHA über in große, pyroninophile und wieder teilungsfähige Blastzellen[16-25].

Diese in vitro-Stimulation der Lymphozyten fand großes Interesse, da Lymphozyten im Zuge der Immunreaktion ähnliche Veränderungen durchmachen; die dabei auftretenden Blastzellen[26] sind von den PHA-Blasten morphologisch nicht zu unterscheiden. Während bei der PHA-Stimulation aber keine Differenzierung über das Blastzellstadium hinaus erfolgt, differenzieren sich die Blastzellen bei der Immunreaktion zu Antikörper-bildenden Zellen.

Die Stimulation durch PHA, die nicht auf menschliche Lymphozyten beschränkt ist, sondern auch für die Lymphozyten verschiedener Versuchstiere gilt, wurde in vielen seither erschienenen Arbeiten (bis 1964 referiert von ROBBINS[21]) genauer untersucht. Diese Arbeiten zeigten, daß durch die Inkubation mit PHA die Syntheserate von RNS[27-32], von DNS[22,25,27,28,32-34] und von Protein[35,36] erhöht wird. Die Einbaurate von Uridin beginnt 4-8 h nach der PHA-Zugabe anzusteigen, ist 24 h nach Kulturbeginn etwa 20 mal so groß wie in der Kontrolle und erreicht nach 48 h einen konstanten Wert[31,32]. Dieser starke Anstieg der Uridin-Einbaurate darf, wie die Arbeiten von LUCAS, 1967[31] und von HAUSEN und STEIN, 1968[32] zeigen, nicht allein der Gen-Aktivierung[33] zugeschrieben werden, da er wohl zum größten Teil auf der Erhöhung der Phosphorylierungsrate des Uridins in PHA-behandelten Zellen beruht; wird die radioaktive Markierung über

die Neusynthese von Pyrimidinnukleotiden eingeführt (z.B. durch markierte Orotsäure), so ergibt sich unter sonst gleichen Bedingungen eine Erhöhung des Einbaues in RNS um nur den Faktor 2[31]. Die synthetisierte RNS besteht in den ersten Stunden nach der PHA-Zugabe wie bei der Kontrolle hauptsächlich aus "löslicher" RNS; mit der Erhöhung der RNS-Syntheserate - etwa 12 h nach Kulturbeginn - ändert sich dieses Bild, und es werden vermehrt Vorstufen ribosomaler RNS gebildet[29,30]. Die Erhöhung der DNS-Syntheserate, gemessen am Einbau von Thymidin, beginnt 20-30 h nach der Zugabe von PHA[25,27,28,32,33]. Die Umwandlung zu Blastzellen erfaßt 74-92%[19] der kleinen Lymphozyten; sie setzt nach ELVES, 1962[17] 20-30 h, nach SABESIN, 1966[19] schon 6-12 h nach PHA-Zugabe ein. Die Zellteilung erfolgt bei den umgewandelten Zellen ungefähr 60-72 h nach Kulturbeginn[19,23].

Die Frage, auf welche Weise PHA das Wachstum der Lymphozyten anregt, ist noch weitgehend ungelöst. Es wurde diskutiert, ob PHA als Antigen wirkt[37-39], oder ob es durch Anheftung an die Zellmembran den Eintritt von mitosestimulierendem Material aus dem Kulturmedium fördert[16], oder ob es durch Präzipitation eines Hemmstoffes aus dem zu dem Kulturmedium gegebenen Serum die Stimulation verursacht[40]. Ein in der letzten Zeit diskutierter Mechanismus geht auf die Beobachtung zurück, daß sich PHA und Antilymphozytenserum in ihrer Wirkung auf Lymphozyten ähnlich verhalten[41,42]. Im Falle des Antilymphozytenserums soll die Besetzung eines bestimmten Rezeptors auf den Lympho-

zyten durch einen spezifisch gegen diesen gerichteten Antikörper der das Wachstum auslösende Reiz sein. Auf PHA übertragen führte dies zu der Vorstellung, daß PHA eine Komponente enthält, die auf einen entsprechenden Rezeptor auf der Lymphozytenoberfläche paßt; die Besetzung des Rezeptors sollte auch hier das Zellwachstum auslösen.

Schon länger ist bekannt, daß PHA neben Erythrozyten und Serumbestandteilen auch Leukozyten agglutiniert[12,43]. In mehreren Arbeiten wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Leukoagglutination und der Stimulation der Lymphozyten besteht. Die erythroagglutinierende Eigenschaft läßt sich aus PHA durch Absorption mit Erythrozyten entfernen, ohne daß gleichzeitig die wachstumsanregende verloren ginge[43]. Entfernt man durch Absorption mit Leukozyten die leukoagglutinierende Komponente, so geht auch die wachstumsanregende verloren[44]. Dieser Befund, zusammen mit dem wiederholten Mißlingen von Versuchen, die leukoagglutinierende und die wachstumsanregende Aktivität des PHA zu trennen, ließ mehrere Forscher einen Zusammenhang zwischen Leukoagglutination und Wachstumsstimulation annehmen[41-44]. Für eine Verschiedenartigkeit dieser beiden Komponenten spricht dagegen eine Arbeit von RIVERA und MUELLER, 1966[45], in der durch Inkubation des PHA mit Natrium-Periodat die mitosestimulierende Eigenschaft zerstört werden konnte, ohne daß die Leukoagglutination beeinträchtigt worden wäre.

Neuerdings wird die Präzipitation eines Hemmstoffes aus dem zum Kulturmedium gegebenen Serum als Wirkmechanismus wieder

stärker diskutiert. Als Hemmstoff käme Makroglobulin der Alpha-2 Fraktion in Frage. Dies Material hat in vivo immunosuppressive Wirkung[46,47], die auf eine Hemmung der auf Antigenkontakt erfolgenden Proliferation der Lymphozyten zurückgeführt wird. Es konnte in vitro gezeigt werden, daß Zugabe von homologem Alpha-2 Globulin zu Lymphozyten die auf Antigen- oder PHA-Kontakt erfolgende Erhöhung der Einbaurate von Aminosäuren in Protein und von P^{32} in DNS verhindert[36]. Der Befund, daß PHA nach Absorption mit Alpha-2 Makroglobulin in der Haut keine hämorrhagischen Lesionen mehr verursacht, weist in dieselbe Richtung[48].

Die bisher genannten Ergebnisse wurden hauptsächlich in vitro gewonnen. Die wenigen Befunde über die Wirkung von PHA im tierischen bzw. menschlichen Organismus widersprechen sich noch. GAMBLE, 1966[49] zeigte, daß PHA in vivo (Maus) eine Erhöhung der Zahl der Lymphozyten in der Milz bewirkt. Er stellte sich die Frage, ob diese Stimulation zu einer verstärkten Immunreaktion führt. GAMBLE[50] konnte für Rattenerythrozyten als Antigen die erwartete Erhöhung des Antikörpertiters bei PHA-vorbehandelten Tieren nachweisen; für menschliches Gamma-Globulin als Antigen blieb diese Erhöhung jedoch aus. ELVES, 1967[51] und SPREAFICO und LERNER, 1967[52] fanden nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA eine starke Suppression der Immunreaktion. Im Gegensatz zu GAMBLE injizierten sie PHA nicht intravenös sondern intraperitoneal. ELVES hatte als Versuchstiere Ratten und als Antigen Hühnererythrozyten, SPEAFICO und LERNER hatten statt dessen Mäuse und Schafserythrozyten verwendet. In der

Diskussion führen beide Gruppen die Immunosuppression durch PHA auf eine denkbare Transformation der Lymphozyten in den Versuchstieren zu Blastzellen zurück; als Blastzellen sollten sie zur Immunreaktion nicht mehr fähig sein und so das Ausbleiben derselben bewirken.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich ebenfalls mit der Wirkung von PHA in vivo (in Mäusen). In Teil I der Ergebnisse wird die Wirkung von intraperitoneal injiziertem PHA auf die Infektion mit einem Mäuseleukämievirus beschrieben. Teil II zeigt, daß die Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA den Übergang eines Bakteriophagen aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf drosselt. Es wird gezeigt, daß diese Drosselung auch für das Mäuseleukämievirus gilt und damit für die Suppression der Leukämievirus-Erkrankung verantwortlich ist. Im dritten Teil wird die PHA-bedingte Suppression der Immunreaktion gegen einen Bakteriophagen als Antigen untersucht. Es ergibt sich, daß auch die Immunosuppression auf die Drosselung des Überganges aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf zurückzuführen ist.

MATERIAL und METHODEN

1. Versuchstiere

Es wurden ausschließlich Albinomäuse (15-20 g; ♀♀ oder ♂♂) des Inzuchtstammes STU der eigenen Zucht verwendet. Die Tiere wurden zu je 10 in Makrolonkästen, Typ II, gehalten. Futter (Latz Mäusefutter in Pelletform) und Wasser standen ad libidum zur Verfügung. Die Tiere wurden auf die einzelnen Versuchsgruppen, die üblicherweise aus je 10 Mäusen bestanden, statistisch verteilt.

2. Entnahme von Blutproben, Spülung der Bauchhöhle

Kleine Blutmengen (0,01 ml) wurden den Mäusen nach Abschneiden der Schwanzspitze mit sterilen 0,1 ml Pipetten abgenommen. Zur Gewinnung kleiner Serumproben wurde der Sinus orbitalis mit silikonierten Kapillaren (Schmelzpunktbestimmungsröhrchen 1,3 x 80 mm) punktiert, deren eines Ende nach der Füllung mit Plastelin verschlossen wurde. Nach der Gerinnung des Blutes und der Abpressung des Serums wurden die Kapillaren zentrifugiert (1500 g, 10') und das Serum durch Auseinanderbrechen der Kapillaren gewonnen. Größere Mengen Blut (bis 1 ml) wurden durch Ausbluten an der linken Axillaris gewonnen. Die Tiere wurden dazu durch eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml Nembutal (5-aethyl-5-(1'-methylbuthyl) barbitursaures Natrium 50 mg/ml, 1:4 verdünnt) narkotisiert. Durch einen Schnitt vom Sternum zur linken Achselhöhle wurde die Axillaris freigelegt

und gleichzeitig zwischen Brustkorb und Haut eine Höhlung geschaffen. Nach Durchschneiden der Axillaris sammelte sich hierin das Blut, welches mit einer Injektionsspritze abgesogen wurde.

Die Spülung der Bauchhöhle wurde wie folgt durchgeführt: 5 ml sterile Hank's Salzlösung (BSS) (6,8 g NaCl, 0,4 g KCL, 0,14 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O, 2,2 g $NaHCO_3$ in 1 l Aqua bidest.) wurden der jeweiligen Maus intraperitoneal injiziert, anschliessend wurde diese durch Genickbruch getötet und dann die Flüssigkeit in der Bauchhöhle 20 mal hin und her geknetet. Unter weiterem Kneten wurde die Flüssigkeit wieder abgesogen; die Ausbeute betrug normalerweise ca. 4 ml.

3. Friend-Leukämievirus (FLV)

Das Friend-Mäuse-Leukämievirus[1] wurde in erwachsenen STU-Mäusen etwa alle 4 Wochen passagiert, wobei die Milz erkrankter Tiere als Virusquelle diente. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet, die Milz steril entnommen und mit 9 Gewichtsteilen steriler Hank's Salzlösung (BSS) in einem Dounce Homogenisator mit "T" Stempel homogenisiert. Die groben Zelltrümmer wurden aus dem Homogenat durch 10-minütige Zentrifugation in der Kälte bei 1500 g abgetrennt. Die etwa 20 g schweren Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml des Überstandes infiziert. Auch das für die Versuche benötigte FLV wurde auf diese Weise stets frisch aus Milzhomogenaten gewonnen; in Versuchen, in denen FLV intravenös gespritzt werden

sollte, wurde das Homogenat durch eine kurze, höhertourige Zentrifugation (Spinco R 30, 10 000 U/min, 10') weiter geklärt; die Infektiosität der Viruspräparation bleibt davon unberührt.

4. FLV-Titration

Der Titer von FLV-Präparationen wurde nach PLUZNIK und SACHS[9] bestimmt. Durch die Infektion mit FLV entstehen auf der Milz Zellkolonien, deren Zahl der injizierten FLV-Dosis proportional ist[10]. 6 Tage nach der Infektion (ip) mit FLV wurde den Versuchstieren die Milz entnommen und zur Sichtbarmachung der Zellkolonien in eine Mischung aus 91 Teilen 70 %-igen Äthanols, 4,5 Teilen Eisessig und 4,5 Teilen Formol (40 %) getaucht. Die Kolonien werden nach kurzer Zeit als helle Flecken von ca. 0,5 mm Ø auf dunklem Grund sichtbar. Der Titer des Milzhomogenates ergab sich unter den gewählten Versuchsbedingungen zu etwa 1000-2000 KBE/ml (Kolonie-Bildende Einheiten).

5. Bakteriophage T_4

Die rII Mutante 1272 des Bakteriophagen T_4 wurde in Zellen von E.coli B vermehrt. Hierzu wurden die Bakterien bei 37°C in 500 ml Kulturmedium (17,5 g Bacto Penassay Broth (DIFCO), 10 g $(NH_4)_2SO_4$, 20 g Glucose auf 1 l Aqua demin., mit 30 %-iger NaOH auf pH 7,3 gebracht) in einer waagrecht liegenden, schnell rotierenden und gut belüfteten 10 l Flasche auf 10^9 Zellen/ml angezüchtet. Nach Neutralisation des Mediums mit 30 %-iger NaOH

auf pH 7,3 wurde die Kultur bis zu einer Zelldichte von $3x10^9$ Zellen/ml weiterinkubiert und nach nochmaliger Neutralisation mit insgesamt $6x10^{12}$ PBE T_4-Phage (Plaque Bildende Einheiten) infiziert (Multiplizität 4). Die Phagen waren durch Infektion einer 20 ml Kultur von E.coli B mit T_4-Phagen eines Einzelplaque gewonnen worden. Dem Rohlysat wurde etwas Chloroform zugesetzt und die Bakterienbruchstücke steril in der Kälte abzentrifugiert (Servall, SS-1, 9000 U/min, 10'). Die Phagen wurden durch hochtourige Zentrifugation (15 000 U/min, 120') aus dem Überstand absedimentiert, in sterilem Phagenpuffer (10 ml 0,1 m $MgSO_4$, 1 ml 0,1 m $CaCl_2$, 1 ml 1 %-ige Gelatine, 3,7 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 1,5 g KH_2PO_4, 4 g NaCl, 5 g K_2SO_4 in 1 l Aqua bidest.) resuspendiert und auf eine Konzentration von ca. $2x10^{12}$ PBE/ml eingestellt. Die für jeden Versuch benötigte Phagenmenge wurde der steril bei 4°C gelagerten Suspension nach gutem Umschütteln entnommen und in BSS nach Bedarf verdünnt.

6. T_4-Titration

Zur Titerbestimmung wurde die "Top Layer"-Methode verwendet[53]. 2 ml flüssiger Weichagar (45°C), 0,1 ml verdünnte Phagenlösung und 2 Tropfen einer Übernachtkultur von E.coli B (ca. $2x10^8$ Zellen) wurden gemischt und auf einen Tag vorgetrocknete Agarplatten ausgegossen (10 cm Ø, 25 ml TC-Agar, bestehend aus 10 g Bacto Tryptone, 10 g Bacto Yeast Extract, 10 g Bacto Agar (DIFCO), 8 g NaCl, 1 g Glucose und 0,05 g $CaCl_2$ in 1 l Aqua

demin.; Weichagar enthielt bei sonst gleicher Zusammensetzung 6 g Agar). Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 37°C 6 Stunden lang bebrütet. Aus der Zahl der Plaques in der hochgewachsenen Bakterienschicht wurde der Titer der Phagenlösung in PBE/ml bestimmt.

Die T_4-Konzentration in Blutproben sowie in Bauchhöhlenspülungen wurde ohne vorheriges Abzentrifugieren der Erythrozyten bzw. der Peritonealexsudatzellen direkt aus der verdünnten Blutprobe bzw. der Spülflüssigkeit bestimmt. Kontrollversuche hatten gezeigt, daß die Anwesenheit der Zellen das Ergebnis der Titerbestimmung nicht beeinflußt.

7. Test auf neutralisierende Antikörper

Die Menge neutralisierender Antikörper im Serum gegen T_4 immunisierter Tiere wurde durch folgenden Ansatz bestimmt: Blutproben von 0,01 ml wurden in Röhrchen mit 0,5 ml Phagensuspension (eisgekühlt, ca. 4000 PBE/ml) gegeben und mit dieser gut vermischt. Bei 37°C wurde im Wasserbad 60' lang inkubiert und nach Beendigung der Reaktion (durch Zurücksetzen der Proben ins Eisbad) der Phagentiter der Reaktionsgemische bestimmt. Aus dem Titerabfall gegenüber den mit Blut nicht immunisierter Tiere inkubierten Proben läßt sich die Neutralisation berechnen und in Prozent angeben. Für Versuche, in denen die Neutralisation des Blutes aller Tiere einer Versuchsgruppe gemeinsam bestimmt werden sollte, wurde ein entsprechend größeres Volumen Phagenlösung für das Inkubationsgemisch eingesetzt.

8. Reagentien

Die Untersuchungen wurden mit Phytohämagglutinin P (PHA-P, DIFCO) verschiedener Kontrollnummern durchgeführt. Bezüglich der Suppression des T_4-Übertrittes zeigten alle diese Proben die gleiche Aktivität. PHA wurde in trockenem Zustand bei ca. $4^{o}C$ aufbewahrt und für jeden Versuch frisch mit steriler BSS angesetzt.

Rinder-Serum-Albumin (SERVA, Cohn Fr.V) - in einem Versuch an Stelle von PHA verwendet - wurde ebenfalls erst vor dem Versuch mit steriler BSS angesetzt.

9. Fehlerrechnung

Für die Fehlerrechnung, die für alle Versuche mit mehreren Meßwerten pro Meßpunkt durchgeführt wurde, wurde folgende Formel (für den mittleren Fehler des aritmetischen Mittels) verwendet[54]:

$$M = \pm \sqrt{\frac{[vv]}{n(n-1)}} \left(1 \pm \sqrt{\frac{1}{2(n-1)}} \right)$$

Dabei ist $[vv] = v_1^2 + v_2^2 + \ldots + v_n^2$ und v_i die Abweichung der Einzelmessung i vom arithmetischen Mittel. n ist die Zahl der Einzelmessungen für einen Meßpunkt.

E R G E B N I S S E

Teil I Suppression der FLV-Erkrankung durch Vorbehandlung mit PHA

Im folgenden soll die Wirkung von intraperitoneal appliziertem PHA auf die Erkrankung nach FLV-Infektion untersucht werden. Die FLV-Erkrankung wird dabei allein durch die Zahl der sich auf der Milz entwickelnden Kolonien charakterisiert. Diese Art der Beschreibung hat zur Voraussetzung, daß die PHA-Behandlung nur die Stärke der FLV-Erkrankung beeinflußt, deren Verlauf aber unverändert beläßt. Durch Vorversuche wurde sichergestellt, daß dies zutrifft.

1. Abhängigkeit der Suppression der FLV-Erkrankung von der Dosis der PHA-Vorbehandlung

In welcher Weise die Stärke der FLV-Erkrankung von der Dosis der PHA-Vorbehandlung abhängt, zeigt Abbildung 1a. Der entsprechende Versuch wurde folgendermaßen durchgeführt:
23 h vor der intraperitonealen Infektion mit 0,2 ml eines 1:4 verdünnten FLV-Homogenates bekamen die Tiere der 5 Versuchsgruppen (je 10 Tiere) eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml verschieden konzentrierter PHA-Lösungen (Konzentrationen: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 und 1,7 mg PHA/ml). 10 Tiere ohne Vorbehandlung bildeten die Kontrolle. In Abbildung 1a ist die Zahl der Milzkolonien (als Maß der FLV-Erkrankung) in Abhängigkeit von der Dosis der PHA-Vorbehandlung dargestellt; sie zeigt, daß Vorbe-

Kolonien
pro Milz

Konzentration der injizierten PHA-Lösung, mg PHA/ml

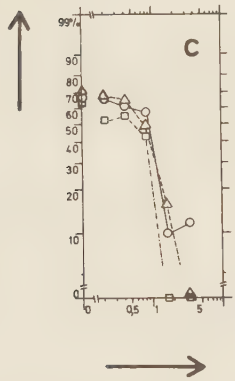
Abbildung 1a: Suppression der FLV-Erkrankung durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA (0,2 ml ip, 23 h vor der FLV-Injektion): Abhängigkeit der Suppression von der PHA-Dosis.

Abbildung 1b: Suppression des T_4-Überganges aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA (0,2 ml ip, 25 h vor der T_4-Injektion): Abhängigkeit der Suppression von der PHA-Dosis (—o—). Gleichfalls eingezeichnet ist die Wirkung einer Vorbehandlung der Versuchstiere mit Rinder-Serum-Albumin (RSA) an Stelle von PHA (--●--, 0,2 ml RSA ip, 24 h vor der T_4-Injektion).

T_4-Titer
im Blut

Konzentration der injizierten PHA-Lösung, mg PHA/ml

Abbildung 1c: Suppression der Immunreaktion gegen intraperitoneal injizierte T_4-Phagen durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA (0,2 ml ip, 25 h vor der T_4-Injektion): Abhängigkeit der



Suppression von der PHA-Dosis. Der Test auf neutralisierende Antikörper wurde 3 Tage (—○—), 4 Tage (-△-), bzw. 6 Tage (··□··) nach der Antigeninjektion (0,2 ml ip, 2.10^{10} PBE T_4/ml) durchgeführt.

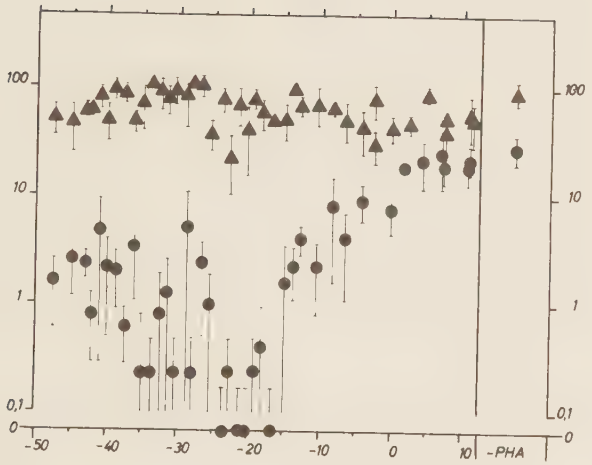
handlung mit einer Dosis von 0,34 mg PHA pro Maus die stärkste Suppression der Milzkolonienzahl bewirkt. Der Suppressionsfaktor beträgt etwa 70.

Für diese Dosis wird im folgenden Experiment untersucht, wie die Suppression der Milzkolonienzahl von der Zeitspanne zwischen PHA-Injektion und FLV-Infektion abhängt.

2. Abhängigkeit von der Zeit zwischen PHA- und FLV-Injektion

Die Tiere der 40 Versuchsgruppen (je 5 Tiere) bekamen eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml PHA (1,7 mg/ml) zu verschiedenen Zeiten vor bzw. nach der intraperitonealen Infektion mit 0,2 ml eines 1:4 verdünnten FLV-Homogenates. Die Kontrolle bildeten 10 Tiere ohne PHA-Injektion. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 2 zu sehen. Die Abszisse zeigt die Zeit der PHA-Injektion relativ zur Infektion mit FLV, für welche die Zeit t=0 eingesetzt wurde, die Ordinate in logarithmischer Darstellung die Zahl der Milzkolonien. Aus der Abbildung 2 (gefüllte Kreise) geht hervor, daß eine intraperitoneale Injektion von PHA 17-24 h vor der intraperitonealen Infektion mit FLV die Ausbildung der Milzkolonien um mindestens den Faktor 100 supprimiert. Der Suppressionsfaktor ist vor dieser Zeitspanne, also zwischen 48 und 27 h vor FLV-Infektion, etwa 20, danach, d.h. in der Zeit zwischen 15 h vor und der FLV-Infektion selbst, wird er stetig kleiner und ist bei t=0 von 1 (keine Suppression) nicht mehr signifikant verschieden. Eine intraperitoneale PHA-Injektion nach der Infektion mit FLV hat auf die Zahl der Milzkolonien keinen supprimierenden Einfluß mehr.

Kolonien
pro Milz



Zeit der PHA-Injektion in Stunden, bezogen auf die Infektion mit FLV zur Zeit t=0.

Abbildung 2: Suppresssion der FLV-Erkrankung durch intraperitoneale Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA: Abhängigkeit der Suppression von der Zeit zwischen PHA- und FLV-Injektion. Im einen Experiment wurde mit FLV intraperitoneal, im anderen intravenös infiziert.

3. Wirkung einer intraperitonealen PHA-Vorbehandlung auf intravenöse FLV-Infektion

Der Aufbau dieses Versuches entspricht dem des vorigen Experiments; der einzige Unterschied besteht in der Applikationsart des FLV, welches hier intravenös gespritzt wurde. Die verwendete FLV-Präparation war 1:4 verdünntes, hochtourig geklärtes Milzhomogenat. Das Ergebnis dieses Versuches ist ebenfalls in Abbildung 2 eingezeichnet (gefüllte Dreiecke); die Abbildung zeigt, daß eine intraperitoneale Behandlung mit PHA auf die intravenöse Infektion mit FLV keinen supprimierenden Einfluß hat.

4. Übergang von FLV aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf

Unter der Voraussetzung, daß bei der intraperitonealen Infektion mit FLV das Virus über die Blutbahn zu den infizierbaren Zellen der Milz gelangt, muß aus dem Ergebnis der beiden letzten Versuche geschlossen werden, daß in Folge der intraperitonealen Vorbehandlung mit PHA eine kleinere Menge infektiösen Virusmaterials von der Bauchhöhle in die Blutbahn gelangt als bei der unbehandelten Kontrolle. Nimmt man an, daß die Halbwertszeit für die Eliminierung des FLV aus dem Blut unabhängig von der intraperitonealen Vorbehandlung mit PHA ist, so sollte sich diese Folgerung experimentell prüfen lassen: Der FLV-Titer von Blutproben - PHA-behandelten Tieren kurze Zeit nach einer intraperitonealen FLV-Injektion entnommen - sollte deutlich gegenüber dem Titer in Proben aus unbehandelten Tieren supprimiert sein.

Durch folgendes Experiment wurde diese Überlegung geprüft: 10 Tiere einer Gruppe von Mäusen, welche 20 h zuvor eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml PHA (1,7 mg/ml) erhalten hatten und diejenigen einer gleichstarken unbehandelten Kontrollgruppe bekamen zur selben Zeit eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml unverdünnten FLV-Homogenates. 1-2 h danach wurden die Versuchstiere einzeln axillar ausgeblutet, und je 0,2 ml des noch nicht geronnenen Blutes zur Bestimmung des FLV-Titers in 3 unbehandelte Mäuse intraperitoneal gespritzt. Wie Tabelle I zeigt, entspricht das Ergebnis dieses Versuches den Erwartungen. Im Blute der unbehandelten Tiere erreicht der FLV-Titer nach der intraperitonealen Injektion von FLV den Wert 8,9 KBE/ml, im Blute der Tiere, die 20 h vor der FLV-Injektion die PHA-Injektion bekommen hatten, dagegen nur 0,35 KBE/ml. Aus diesen beiden Titern ergibt sich ein Suppressionsfaktor von 25 (12 ... 110). Im Rahmen der Meßgenauigkeit entspricht diese Suppression dem aus den vorhergehenden Experimenten ermittelten Wert (50 ... 100).

Tabelle I: Übertritt von FLV aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf

Ohne PHA-Vorbehandlung											Mittelwert
Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kolonien/ml
Milzkolonien pro 0,2 ml Blut, 3 Messungen	0	6	1	3	4	0	3	2	4	3	8,9 ± 1,75
	1	0	1	3	5	0	5	0	0	2	
	2	-	2	2	-	0	4	0	0	1	
Mit PHA-Vorbehandlung (0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml, 20 h vor der Injektion von FLV)											
Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Milzkolonien pro 0,2 ml Blut, 3 Messungen	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,35 ± 0,25
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Suppressionsfaktor											25 (12...110)

Teil II Suppression des Virusübertrittes (T_4-Phage) aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA

Die Ergebnisse der Versuche 3 und 4 in Teil I - eine intraperitoneale Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA supprimierte die Infektion mit FLV, wenn es intraperitoneal, nicht jedoch, wenn es intravenös injiziert wurde - führten zu der Ansicht, daß der Angriffspunkt der PHA-Wirkung am Virusübergang von der Bauchhöhle ins Blut zu suchen sei. Das Ergebnis des letzten Versuches stand mit einem solchen Mechanismus in Einklang. Dieser Versuch zeigte, daß der FLV-Titer, den man eine Stunde nach intraperitonealer Virusinjektion im Blut erhält, im Falle der PHA-behandelten Tiere um vieles niedriger ist als in den unbehandelten (mit neusynthetisiertem Virus muß man nicht rechnen; solches ist frühestens 5 Tage nach der Infektion im Blute nachweisbar). Im vorliegenden Abschnitt soll nun diese Suppression des Virusübertrittes charakterisiert werden. Es wird hierzu nicht mehr das FLV, sondern ein Bakteriophage verwendet. Dies ist möglich, da es sich gezeigt hatte, daß die PHA-bedingte Suppression des Virusübertrittes aus der Bauchhöhle ins Blut nicht auf FLV beschränkt ist, sondern auch für den T_4-Bakteriophagen gilt.

Bakteriophagen weisen gegenüber FLV einige experimentelle Vorteile auf: sie stehen in hoher Konzentration zur Verfügung, sind in Mäusen nicht pathogen und lassen sich durch die "top

layer"-Methode in kurzer Zeit quantitativ nachweisen. Für ihre Verwendung sprach weiter ihre Eigenschaft, im allgemeinen ein gutes Antigen darzustellen und durch Neutralisation einen einfachen Nachweis der gegen sie gebildeten Antikörper zu erlauben. Dies ist im Hinblick auf die in Teil III beschriebene Immunosuppression von Bedeutung, da die Verwendung desselben Bakteriophagen bei der Untersuchung der Suppression des Virusüberganges und der Immunosuppression einen guten Vergleich der beiden Wirkungen des PHA zuläßt.

1. Abhängigkeit der Suppression des Virusübertrittes von der Dosis der PHA-Vorbehandlung

Die Suppression des Virusübertrittes - gemessen als Suppression des T_4-Titers im Blut der Versuchstiere 1 h nach intraperitonealer T_4-Injektion - ist in Abhängigkeit von der Dosis der PHA-Vorbehandlung in Abbildung 1b dargestellt.

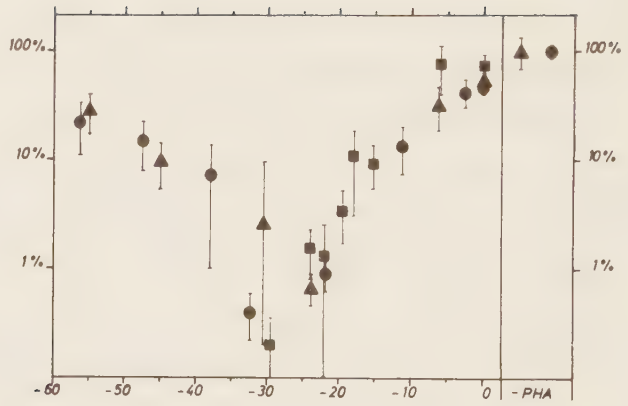
25 h vor der Injektion von T_4 (0,2 ml - 10^8 PBE/ml) bekamen die Tiere der 5 Versuchsgruppen (je 10) eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml PHA-Lösung. Die verwendeten Konzentrationen betrugen 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,7 und 3,4 mg PHA/ml. 10 Tiere ohne Vorbehandlung bildeten die Kontrolle. In der Abbildung ist der Titer der Blutproben, die den Tieren 1 h nach der T_4-Injektion an der Schwanzspitze abgenommen wurden, in logarithmischer Form gegen die Dosis der PHA-Vorbehandlung aufgetragen. Man sieht, daß Vorbehandlung mit einer Dosis von 0,34 bzw. 0,68 mg PHA eine starke Suppression des sich im Blute ergebenden T_4-Titers bewirkt. In ihrer Stärke (Suppres-

sionsfaktor etwa 100) und in ihrer Abhängigkeit von der PHA-Dosis entspricht sie der Suppression der FLV-Erkrankung (Abb.1a).

2. Abhängigkeit der Suppression des Virusübertrittes von der Zeit zwischen PHA- und T_4-Injektion

Die Abhängigkeit der Suppression von der Zeit zwischen PHA-Injektion und T_4-Injektion ist in der Abbildung 3 gezeigt, welcher 3 Experimente zugrunde liegen. Die Tiere der Versuchsgruppen (je 10) bekamen - wie diejenigen im vergleichbaren Versuch mit FLV - zu verschiedenen Zeiten vor der Injektion des T_4-Phagen eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml PHA (1,7 mg/ml). Die Tiere der Kontrollgruppen blieben unbehandelt. Die Konzentration der T_4-Lösung, mit der zur Zeit t=0 die intraperitoneale Injektion durchgeführt wurde, betrug im einen Experiment 10^6 PBE/ml, in den beiden anderen 10^{10} PBE/ml. Die Blutproben von 0,01 ml wurden den Tieren 1 h nach der T_4-Injektion an der Schwanzspitze abgenommen und einzeln nach T_4 titriert. Um die drei Versuche vergleichen zu können, ist in der Abbildung der T_4-Titer in Prozent der Kontrolle aufgetragen; die Abszisse zeigt die Zeit der PHA-Injektion bezogen auf die Injektion von T_4 (t=0). Ein Vergleich der Ergebnisse dieses Versuches (Abb.3) mit denen aus dem Versuch mit FLV (Abb.2) zeigt, daß - mit Ausnahme der genauen Lage des Suppressionsmaximums - für die Suppression des T_4-Überganges aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf

T_4-Titer im Blut, in % der Kontrolle



Zeit der PHA-Injektion in Stunden, bezogen auf die Injektion von T_4 zur Zeit t=0.

Abbildung 3: Suppression des T_4-Überganges aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf durch intraperitoneale Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA: Abhängigkeit der Suppression von der Zeit zwischen PHA- und T_4-Injektion. Die Abbildung zeigt den T_4-Titer im Blut der PHA-behandelten Versuchstiere (1 h nach der intraperitonealen Injektion von T_4) in % der unbehandelten Kontrolle. In einem Experiment betrug die injizierte T_4-Konzentration 10^6 PBE/ml, in den beiden anderen 10^{10} PBE/ml.

dieselbe Zeitabhängigkeit gilt wie für die Suppression der FLV-Erkrankung. Im ersten Falle bekommt man die stärkste Suppression (Suppressionsfaktor etwa 100) durch eine PHA-Injektion 30-25 h vor der T_4-Injektion, während bei der Suppression der FLV-Erkrankung die PHA-Injektion 24-17 h vor der FLV-Injektion erfolgen muß, um volle Wirkung zu haben.

3. Prüfung der Spezifität der PHA-Wirkung

Zur Prüfung der Frage, ob die beobachtete Suppression des T_4-Überganges spezifisch ist für die Vorbehandlung mit PHA, oder nur eine Folge seiner antigenen Eigenschaften ist, wurde in einem Versuch an Stelle von PHA ein anderes Antigen - Rinderserumalbumin (RSA) - zur Vorbehandlung der Versuchstiere verwendet. Der Versuchsaufbau war ähnlich wie für die Ermittlung der Dosisabhängigkeit der PHA-Wirkung: 24 h vor der Injektion von T_4 (0,2 ml ip, 10^8 PBE/ml) bekamen die Tiere (je 10) der einzelnen Gruppen eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml RSA-Lösung verschiedener Konzentrationen (0,8 - 1,7 - 6,8 mg RSA/ml). Eine Stunde nach der T_4-Injektion wurden den Tieren Blutproben am Schwanz abgenommen und nach T_4 titriert. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 1b eingezeichnet (gefüllte Kreise). Man sieht, daß eine RSA-Vorbehandlung keine Suppression des T_4-Überganges aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf bewirkt.

4. Berechnungen zum Virusübertritt

Es wurde bisher stets von "Suppression des Virusübertrittes" gesprochen. Genau gesehen ist diese Ausdrucksweise noch nicht zulässig. Gemessen wurde nämlich nie der Übergang selbst, sondern immer nur der Virustiter, der sich durch diesen im Blut ergibt.

Betrachtet man die Faktoren, von denen dieser Virustiter abhängt, so sieht man, daß auch die Geschwindigkeit, mit der die Viruskonzentration in der Bauchhöhle bzw. im Blute abnimmt, hier eine Rolle spielt. Wir machen über diese und den dritten Faktor, der den Übertritt selbst bestimmt, die folgenden Annahmen:

1.) Die Geschwindigkeit, mit der die Viruskonzentration im Blut (C_2) - ohne Zustrom - abnimmt, sei der Viruskonzentration selbst proportional; k_2, die dazugehörige Eliminationskonstante, hat die Dimension 1/min.

2.) Der Virusstrom von der Bauchhöhle ins Blut sei der momentan dort herrschenden Viruskonzentration proportional; der Proportionalitätsfaktor k_3, der gleichfalls die Dimension 1/min hat, stellt dann das Verhältnis des pro Zeiteinheit aus der Bauchhöhle überströmenden "Volumens" zum Blutvolumen dar.

3.) Die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme in der Bauchhöhle durch Abstrom und sonstige Elimination von Virus sei ebenfalls der Konzentration selbst proportional. Ist k_1

die dazugehörige Konstante, so ergibt sich für den zeitlichen Verlauf des Virustiters in der Bauchhöhle $C_1 = C_1(0).e^{-k_1 t}$

Es läßt sich mit diesen Annahmen für den zeitlichen Verlauf der Viruskonzentration im Blut die Differentialgleichung

$$\frac{dC_2}{dt} = \underbrace{k_3 C_1(0).e^{-k_1 t}}_{\text{Zustrom}} - \underbrace{k_2 C_2}_{\text{Abstrom}} \qquad (1)$$

aufstellen, deren Lösung ($k_1 \neq k_2$)

$$C_2 = \frac{k_3 C_1(0)}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \qquad (2)$$

ist.

Für $k = k_1 = k_2$ geht diese Gleichung über in

$$C_2 = k_3 C_1(0).\ t\ .\ e^{-kt} \qquad (3)$$

Diese Lösung gibt, wie es sich zeigen wird, den gemessenen Verlauf der Viruskonzentration im Blut gut wieder.

Die zur Aufstellung dieser Gleichung gemachten Annahmen werden später experimentell geprüft werden. Es wird sich zeigen, daß sie zulässig sind.

Anhand der beiden Gleichungen für C_2 läßt sich nun angeben, wie sich eine Veränderung der Parameter k_1, k_2 und k_3 (z.B. durch PHA-Vorbehandlung) auf den Verlauf des Virustiters im Blute nach intraperitonealer Virusinjektion auswirken sollte.

Beide Gleichungen stellen Funktionen von t dar, die zur Zeit $t = 0$ den Wert 0 haben, dann bis zu einem Maximum ansteigen

und später asymptotisch gegen Null abfallen. Diese Charakteristik ist in der Gl.2 durch das Glied ($e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}$) und in Gl.3 durch $t \cdot e^{-kt}$ gegeben. Eine Veränderung der Parameter k_1 und k_2 (bzw. k) wird sich danach vor allem in einer Veränderung der Kinetik niederschlagen. Bei kleinen k_1 und k_2 (langsame Eliminierung des Virus) erreicht C_2 später und bei einer höheren Konzentration sein Maximum als bei größeren Werten von k_1 bzw. k_2; der Parameter mit dem kleineren Wert bestimmt die Geschwindigkeit, mit der C_2 nach dem Maximum gegen Null abfällt. Nimmt man an, die Suppression des Virustiters im Blut (nach intraperitonealer Virusinjektion) beruhe auf einer Vergrößerung der Parameter k_1 und/oder k_2, so sollte die Lage des Maximums und eventuell die Geschwindigkeit des Titerabfalles nach demselben bei Versuch und Kontrolle stark verschieden sein; ergibt sich für k_1 und k_2 in PHA-behandelten Tieren kein nennenswerter Unterschied zu den Werten in unbehandelten Kontrolltieren, so muß man aus den Gl.2 bzw. 3 schließen, daß PHA über die Drosselung des Virusübertrittes aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf (Verkleinerung von k_3) die Suppression des Titers im Blute bewirkt. In diesem Falle erwartet man, daß die Lage des Titermaximums und die Geschwindigkeit des asymptotischen Abfalles danach bei Versuch und Kontrolle gleich sind.

Durch die folgenden Versuche soll geprüft werden, ob die genannten Annahmen für die Berechnung von C_2 zulässig sind, dann soll die Messung der Parameter k_1 und k_2 - mit und ohne PHA-Vorbehandlung - ergeben, welcher Mechanismus für die PHA-Wir-

kung zutrifft.

5. Prüfung der Annahmen für die Berechnung von C_2 auf ihre Gültigkeit, Messung der Parameter k_1 und k_2

In Abbildung 4 ist das Ergebnis eines Versuches dargestellt, in dem die Kinetik des Titerabfalles im Blutkreislauf bestimmt wurde. 10 Mäusen war intravenös 0,2 ml T_4-Lösung (10^5 PBE/ml) gespritzt worden, dann wurde zu verschiedenen Zeiten danach von der Schwanzspitze 0,01 ml Blut abgenommen und dessen Virustiter bestimmt. Die Viruskonzentration im Blute ist in logarithmischer Weise gegen die Zeit der Blutung aufgetragen (Abb.4). Durch die Meßpunkte läßt sich eine Gerade legen; daraus folgt, daß die Annahme eines exponentiellen Abfalls der Viruskonzentration im Blut erfüllt ist. Das Ergebnis des entsprechenden Versuches mit PHA-Vorbehandlung (0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml, 24 h vor der T_4-Injektion gespritzt) ist in dieselbe Abbildung eingezeichnet (Abb.4). Der Abfall der Viruskonzentration im Blut verläuft auch hier exponentiell. Aus den Steigungen der Geraden in Abbildung 4 wurden die Werte der konstanten k_2 und $k_{2,PHA}$ ermittelt. Sie sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Aus diesen Werten ergibt sich, daß die Geschwindigkeit des Abfalles der Viruskonzentration im Blut von einer intraperitonealen Vorbehandlung mit PHA unabhängig ist.

Zunächst wollen wir Annahme 2 zurückstellen und statt dessen Annahme 3 behandeln. Sie besagte, daß die Konzentrationsabnahme von T_4 in der Bauchhöhle der Funktion $C_1 = C_1(0)\, e^{-k_1 t}$

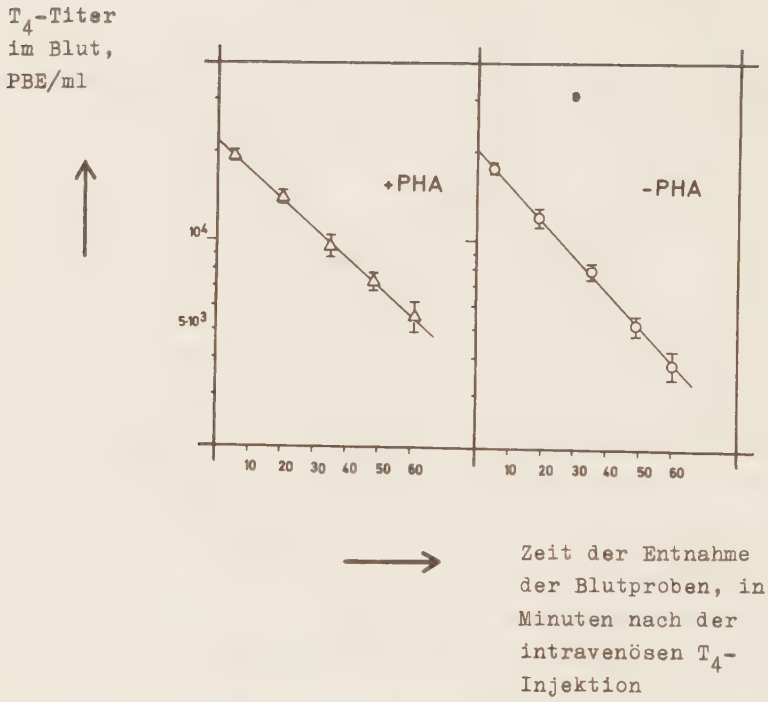


Abbildung 4: Zeitlicher Abfall des T_4-Titers im Blut nach intravenöser Injektion von 0,2 ml T_4-Lösung (10^5 PBE/ml). Die eine Hälfte der Abbildung zeigt den Abfall im Blut PHA-behandelter Versuchstiere (0,2 ml PHA ip, 1,7 mg PHA/ml, 24 h vor der T_4-Injektion), die andere den im Blut unbehandelter Tiere.

folgen solle. Wegen der geringen Flüssigkeitsmenge in der Bauchhöhle läßt sich die Viruskonzentration dort kaum messen. Statt dessen kann man aber bestimmen, welcher Teil des gespritzten Virus sich zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion noch aus der Bauchhöhle auswaschen läßt; findet während der Versuchsdauer keine nennenswerte Resorption des Puffers, in welchem der Phage injiziert wurde, aus der Bauchhöhle statt, so ist die Menge des auswaschbaren Virus ein Maß für die Konzentration in der Bauchhöhlenflüssigkeit.

Abbildung 5 zeigt die Abhängigkeit des T_4-Titers in der Bauchhöhlenspülflüssigkeit von Einzeltieren von der Zeitspanne zwischen Virusinjektion und Spülung für Tiere mit (0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml, 26 h vor der T_4-Injektion gespritzt) und ohne PHA-Vorbehandlung. In beiden Fällen erfolgt der Abfall in erster Näherung exponentiell. Es zeigt sich, daß die PHA-Vorbehandlung einen schnelleren Abfall des Virustiters in der Bauchhöhle zur Folge hat. Die Werte der Konstanten k_1 und $k_{1,PHA}$ wurden aus den Steigungen der Geraden, die sich durch die Meßpunkte legen lassen, ermittelt. Sie sind in Tabelle II eingetragen.

Die Richtigkeit der zweiten Annahme läßt sich nur indirekt prüfen. Ist die Menge des pro Zeiteinheit überströmenden Virusmaterials der Viruskonzentration in der Bauchhöhle proportional, so sollte ein linearer Zusammenhang zwischen der intraperitoneal injizierten Viruskonzentration und dem Titer bestehen, den man nach der Injektion im Blute messen kann. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis eines entsprechenden Versuches:

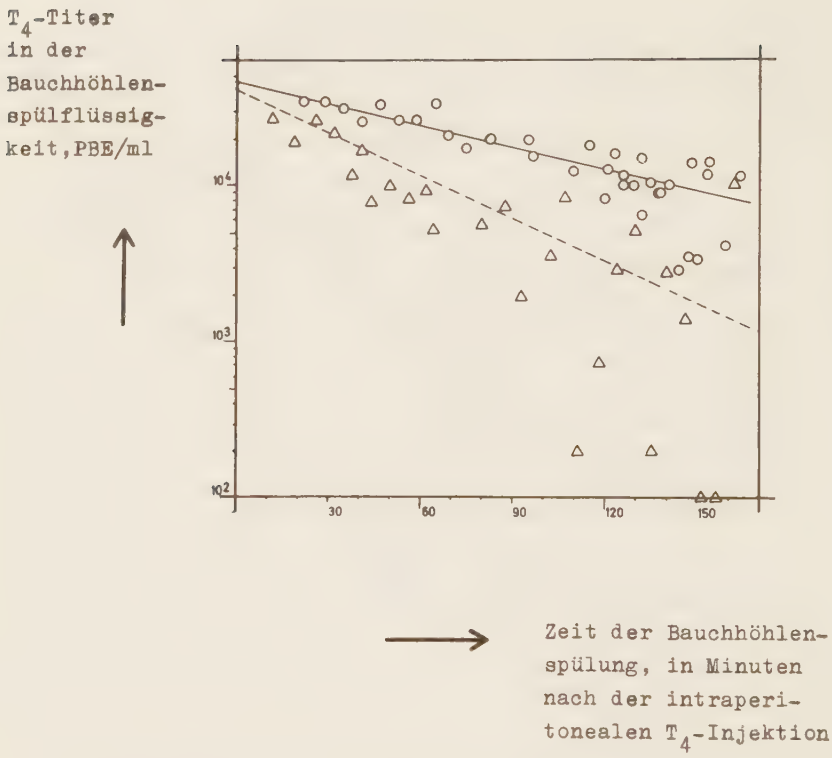


Abbildung 5: Abhängigkeit des T_4-Titers in Bauchhöhlenspülflüssigkeiten von Einzeltieren von der Zeit zwischen der Virusinjektion (0,2 ml ip, 10^6 PBE T_4/ml) und der Spülung (mit 5 ml BSS). O Tiere ohne PHA-Behandlung, Δ PHA-behandelte Tiere (0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml, 26 h vor der T_4-Injektion)

Tabelle II: Halbwertszeiten und Eliminationskonstanten von T_4 in Bauchhöhle und Blutkreislauf von Tieren mit und ohne PHA-Vorbehandlung

	Halbwertszeit $t_{1/2}$	$t_{1/e}$	Eliminationskonstante $\frac{1}{t_{1/e}}$
Bauchhöhle			
-PHA	74 min	107 min	0,0094 1/min
+PHA	34,7 min	50 min	0,02 1/min
Blutkreislauf			
-PHA	25 min	36 min	0,0278 1/min
+PHA	30 min	43 min	0,0232 1/min

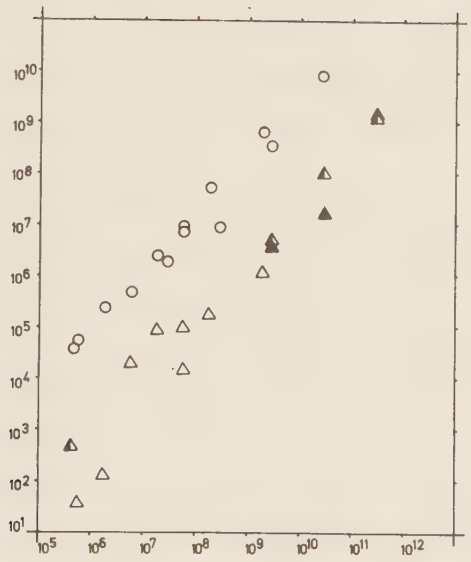
Die PHA-Vorbehandlung bestand in beiden Fällen aus einer intraperitonealen Injektion von 0,2 ml PHA-Lösung, 1,7 mg PHA/ml; im Falle der Bauchhöhle wurde diese 26 h, im Falle des Blutkreislaufes 24 h vor der T_4-Injektion gegeben.

1 h nach der intraperitonealen Injektion von 0,2 ml T_4-Lösung der gewünschten Konzentration (Konzentrationsbereich von 10^6 bis 10^{12} PBE T_4/ml) wurde den Tieren der Versuchsgruppen (je 10) 0,01 ml Blut von der Schwanzspitze abgenommen und der Virustiter dieser Proben bestimmt. In der Abbildung ist der Titer der Blutproben in Abhängigkeit von der injizierten T_4-Konzentration in doppelt logarithmischer Form aufgetragen; man sieht, daß der erwartete lineare Zusammenhang tatsächlich besteht (Abb.6, offene Kreise). In derselben Weise wurde der Versuch mit PHA-vorbehandelten Versuchstieren durchgeführt. In drei verschiedenen Experimenten betrug die Zeitspanne zwischen der intraperitonealen Injektion von 0,2 ml PHA (1,7 mg/ml) und der Injektion der T_4-Lösung 23, 26 bzw. 30 Stunden. Das Ergebnis dieser Versuche ist ebenfalls in Abbildung 6 eingezeichnet (offene Dreiecke). Die Proportionalität zwischen gespritzter Konzentration und dem resultierenden Titer im Blut bleibt auch nach PHA-Vorbehandlung bestehen.

Die drei letzten Versuche haben gezeigt, daß die zur Aufstellung der Differentialgleichung (1) gemachten Annahmen zutreffen. Gleichung 2, die Lösung dieser Gleichung, sollte somit den zeitlichen Verlauf der sich im Blut als Folge einer intraperitonealen Virusinjektion ergebenden Viruskonzentration in guter Annäherung beschreiben.

Weiter haben diese Messungen ergeben, daß die intraperitoneale Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA nur einen geringen Einfluß auf die Eliminationskonstanten von T_4 aus der Bauch-

T_4-Titer im Blut, 1 h nach einer intraperitonealen T_4-Injektion, PBE/ml



Intraperitoneal injizierte T_4-Dosis, PBE/Maus

Abbildung 6: Abhängigkeit des T_4-Titers im Blut (1 h nach einer ip T_4-Injektion) von der gespritzten T_4-Dosis und der PHA-Vorbehandlung. ○ Versuchsgruppen ohne PHA-Behandlung, ▲ 23 h --- △ 26 h --- ◮ 30 h vor T_4-Injektion Behandlung mit PHA (0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml).

höhle bzw. dem Blutkreislauf hat (Tabelle II). Diese geringen Veränderungen reichen nicht aus, die Suppression der Viruskonzentration im Blut um den Faktor 100 zu erklären; durch Einsetzen der gemessenen Werte von k_1, $k_{1,PHA}$ und k_2, $k_{2,PHA}$ in Gleichung 2 kann man sich davon leicht überzeugen. Aus Gleichung 2 ergibt sich nach dieser Feststellung, daß nur eine Veränderung von k_3, der Konstanten, die die Stärke des Übertrittes berücksichtigt, die beobachtete Suppression erklären kann. K_3 ist als einzige Konstante nicht direkt meßbar; es läßt sich eine Veränderung von k_3 durch PHA-Behandlung daher auch nicht unmittelbar nachweisen. Was sich jedoch prüfen läßt, ist, ob die Auswirkungen, die nach Gleichung 2 eine Veränderung von k_3 auf den Verlauf der Viruskonzentration im Blut haben sollte, sich im Experiment nachweisen lassen.

Nach Gleichung 2 geht k_3 nur in die Höhe der Viruskonzentration im Blut ein, der zeitliche Verlauf derselben bleibt von einer Veränderung von k_3 unbeeinflußt. Bewirkt PHA die Suppression der Viruskonzentration im Blut tatsächlich über eine Verkleinerung von k_3, so sollte die Viruskonzentration im Blut von Tieren mit und ohne PHA-Vorbehandlung, ähnlich verlaufen, d.h. die eine Kurve sollte sich durch reine Verschiebung entlang der Achse der Viruskonzentration in die andere überführen lassen.

Dies wird im folgenden Experiment geprüft. Zu verschiedenen Zeiten nach der intraperitonealen Injektion von 0,2 ml T_4-Lösung (Konzentration bei Tieren ohne PHA-Vorbehandlung $1{,}45.10^6$ PBE/ml, bei denen mit Vorbehandlung 10^8 PBE/ml; die Vorbehand-

lung bestand in einer intraperitonealen Injektion von 0,2 ml PHA, 1,7 mg/ml, 28 h vor der T_4-Injektion) wurden den Tieren Blutproben (0,01 ml) an der Schwanzspitze abgenommen und nach T_4 titriert. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Die Viruskonzentration ist in logarithmischer Form gegen die Zeit der Blutung aufgetragen. Jede Kurve zeigt den Verlauf der Viruskonzentration im Blut eines Einzeltieres.

Trotz der starken Streuung zwischen den Kurven einer Versuchsgruppe wird deutlich, daß der Verlauf der Viruskonzentration im Blut von Tieren mit und ohne PHA-Vorbehandlung im wesentlichen derselbe ist. Eine Verschiebung entlang der Achse der Viruskonzentration (Ordinate) um etwas mehr als zwei Zehnerpotenzen führt in erster Annäherung die einen Kurven in die anderen über. Damit entspricht das Ergebnis dieses Versuches den Folgerungen aus Gleichung 2.

Daß der nach dieser Gleichung berechnete Verlauf der Viruskonzentration mit dem gemessenen gut übereinstimmt, zeigt die in Abbildung 7 zusätzlich eingezeichnete Kurve a. Sie stellt den berechneten Verlauf der Viruskonzentration im Blut (ohne PHA-Vorbehandlung) dar. Für k_1 und k_2 wurden in Gl.2 Werte eingesetzt, die den aus Abbildung 4 und 5 bestimmten sehr ähnlich sind. k_3 wurde anschließend so gewählt, daß die berechnete Kurve etwa denselben Höchstwert erreichte wie die gemessenen. Abgesehen von einer Verschiebung entlang der Zeitachse ist der berechnete Kurvenverlauf eine sehr gute Annäherung des gemessenen. Diese Verschiebung von etwa 30 min braucht nicht zu beunruhigen. Sie kann als die Zeit aufgefaßt werden, die das Virus-

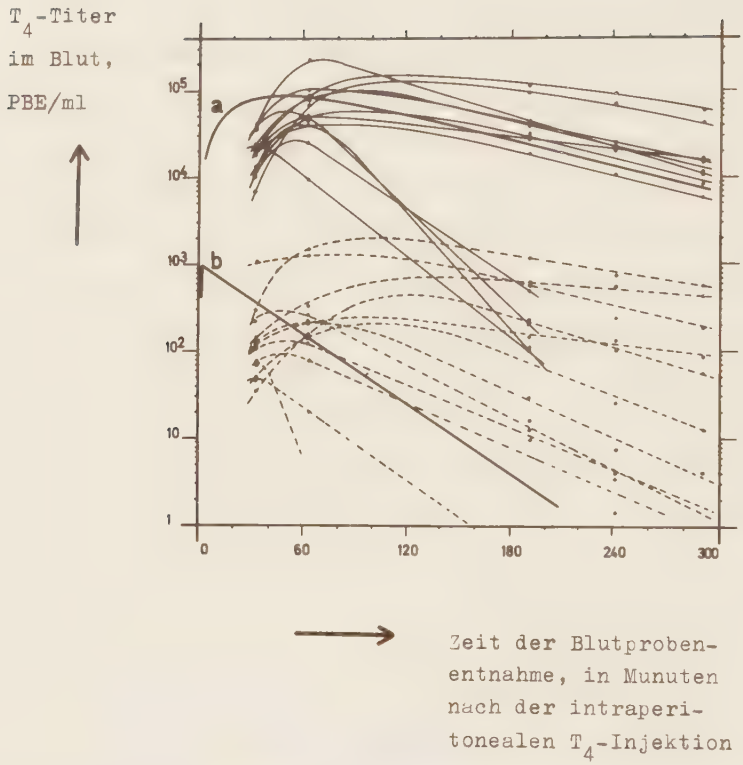


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Viruskonzentration im Blut von Einzeltieren nach einer intraperitonealen Injektion von T_4 (0,2 ml, $1{,}45 \cdot 10^6$ PBE T_4/ml bei Tieren ohne PHA-Behandlung, 10^8 PBE/ml bei Tieren mit PHA-Vorbehandlung (0,2 ml ip, 1,7 mg/ml PHA, 28 h vor der Injektion von T_4)). Für die Gruppe der PHA-behandelten Tiere wurden die erhaltenen Werte der T_4-Konzentration umgerechnet auf eine T_4-Injektion von $1{,}45 \cdot 10^6$ PBE/ml. Die Kurven a und b entstanden durch Einsetzen verschiedener Werte von k_1, k_2 und k_3 in Gleichung 2. Kurve a: $k_1 = 0{,}0125$, $k_2 = 0{,}0316$, $k_3 = 0{,}0035$. Kurve b: $k_1 = 10$, $k_2 = 0{,}0316$, $k_3 = 0{,}0035$. Die Dimension dieser Werte ist 1/min.

material zum Übertritt aus der Bauchhöhle in die Blutbahn benötigt ("lag"-Phase); im Ansatz zur Gleichung 2 war diese nicht berücksichtigt worden.

Die gute Übereinstimmung zwischen tatsächlichem Verlauf des T_4-Übertrittes und dem aus den gemachten Annahmen und der Messung der Eliminationskonstanten berechneten, zeigen deutlich, daß nur eine durch die intraperitoneale Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA verursachte Verkleinerung der Übertrittskonstanten k_3 für die Drosselung der sich im Blut ergebenden Viruskonzentration in Frage kommt.

Teil III Immunosuppression durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA

Von ELVES, 1967[46] und SPREAFICO und LERNER, 1967[47] wurde die Suppression der Immunreaktion (auf fremde Erythrozyten) durch Vorbehandlung mit PHA zuerst beschrieben; dabei wurde diskutiert, ob PHA die Suppression durch die Transformation der Lymphozyten zu Blastzellen bewirkt (s.die Einleitung). Die Ergebnisse der in Teil I und II beschriebenen Versuche legen nahe, den Mechanismus der Immunosuppression wie der Suppression der FLV-Erkrankung in der Drosselung des Materialtransportes (aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf) durch PHA-Vorbehandlung zu sehen. Im folgenden wurde zur Prüfung dieser These die Wirkungsweise von PHA auf die Immunreaktion gegen T_4 als Antigen untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse dieser Versuche mit der Wirkungsweise von PHA bei der Suppression des T_4-Übertrittes wird zeigen, ob die Drosselung des Virustransportes auch bei der Immunosuppression die Grundlage der PHA-Wirkung darstellt.

1. Abhängigkeit der Immunreaktion auf intraperitoneal und intravenös injizierte T_4-Phagen von der PHA-Vorbehandlung

Vergegenwärtigt man sich die allgemeine Abhängigkeit der Immunreaktion von der Dosis des Antigens - unterhalb einer bestimmten Schwelle gibt es keine Immunreaktion, bei Erhöhung der Dosis steigt der sich ergebende Antikörpertiter zuerst

rasch, dann langsamer bis zu einem Maximum an, um bei weiterer Erhöhung der Antigenmenge wieder abzufallen - so erwartet man aus den Versuchen über den T_4-Übertritt, daß sich eine Suppression der Immunreaktion gegen T_4 durch PHA-Vorbehandlung nur in einem eng begrenzten Konzentrationsbereich nachweisen läßt, in welchem eine ausgeprägte Abhängigkeit des Antikörpertiters von der Antigendosis besteht. Um diesen Bereich im Experiment sicher einzuschließen, wurde in den beiden Versuchen mit intraperitonealer bzw. intravenöser Injektion des Antigens die Stärke der Immunreaktion - mit und ohne PHA-Vorbehandlung - für verschiedene Antigen-Dosen ermittelt.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis des Versuches mit intraperitonealer Antigen-Gabe. Den 2 x 5 Versuchsgruppen (je 10 Tiere), 30 bzw. 23 h vor der Antigen-Injektion intraperitoneal mit 0,2 ml PHA, 1,7 mg/ml, vorbehandelt, standen 4 unbehandelte Gruppen gegenüber. Die Konzentration der als Antigen intraperitoneal injizierten (0,2 ml) T_4-Lösung war für die einzelnen Gruppen verschieden groß. Sie überstrich für die unbehandelten Tiere den Bereich von $2 \cdot 10^8$ bis $2 \cdot 10^{11}$ PBE/ml, für die PHA-behandelten Tiere denjenigen von $2 \cdot 10^8$ bis $2 \cdot 10^{12}$ PBE/ml. 4 Tage nach der Antigen-Injektion wurde den Tieren eine Blutprobe von 0,01 ml entnommen und damit die prozentuale Neutralisation bestimmt.

Das Ergebnis des entsprechenden Versuches mit intravenöser T_4-Injektion zeigt Abbildung 9. 24 h vor der T_4-Injektion bekamen 7 Gruppen (je 10 Tiere) eine intraperitoneale PHA-Injektion

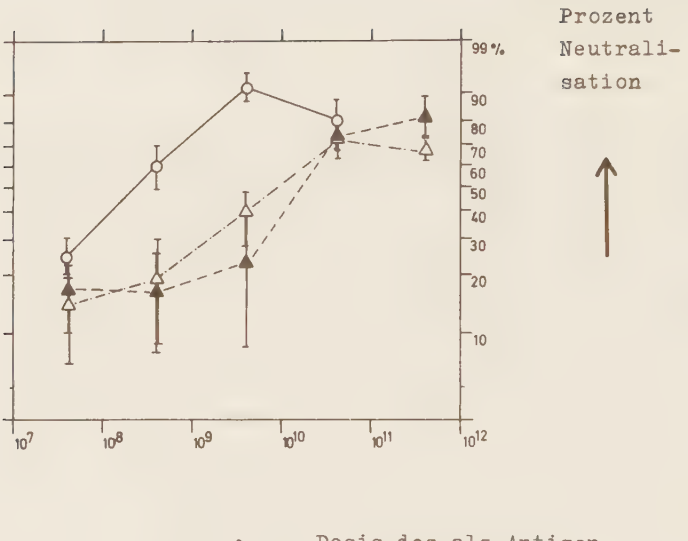


Abbildung 8: Abhängigkeit der Antikörperbildung gegen intraperitoneal injizierte T_4-Phagen von der injizierten T_4-Dosis und der intraperitonealen PHA-Vorbehandlung. ○ ohne PHA-Behandlung, ▲ 23 h, △ 30 h vor der Antigeninjektion mit PHA behandelt (0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml).

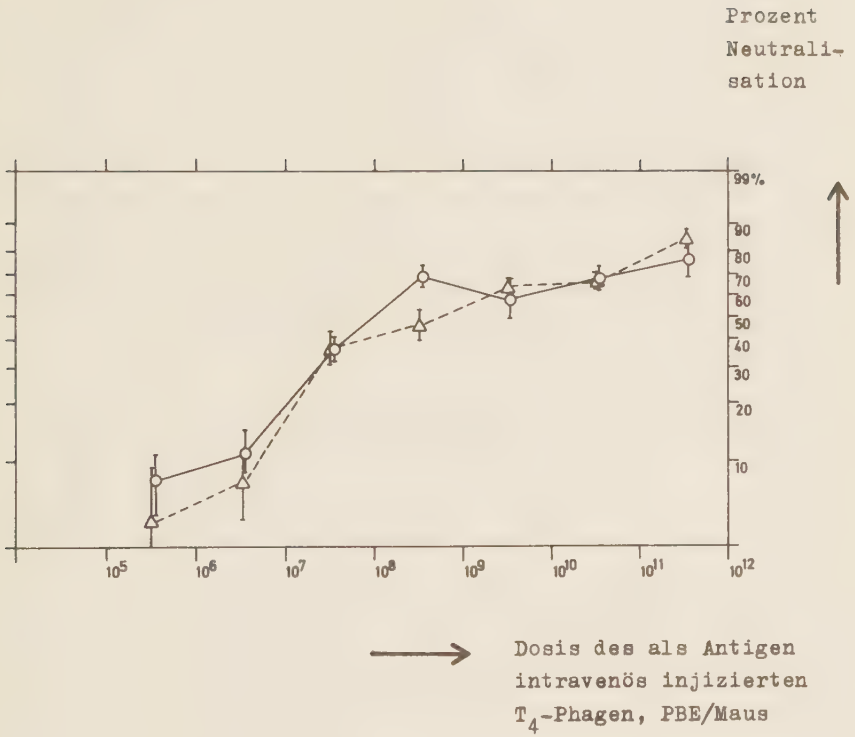


Abbildung 9: Abhängigkeit der Antikörperbildung gegen intravenös injizierte T_4-Phagen von der injizierten T_4-Dosis und der intraperitonealen PHA-Vorbehandlung. ⧲ ohne PHA-Behandlung, ⧳ Versuchstiere 24 h vor der Antigeninjektion mit PHA behandelt (0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml).

von 0,2 ml, 1,7 mg PHA/ml; die Tiere von 7 anderen Gruppen blieben unbehandelt. Die intravenöse Antigen-Injektion bestand für beide Versuchsreihen aus 0,2 ml T_4-Lösung des Konzentrationsbereichs zwischen 2.10^6 und 2.10^{12} PBE/ml. 5 Tage nach der Injektion wurden die Tiere geblutet und die prozentuale Neutralisation ermittelt.

Das Ergebnis der beiden Versuche entspricht den Erwartungen. Während eine intraperitoneale PHA-Vorbehandlung keinen Einfluß auf die Immunreaktion gegen intravenös injizierte T_4-Phagen zeigt (Abb.9), bewirkt sie bei intraperitonealer Antigen-Injektion eine Verschiebung in der Antigendosis-Antikörpertiter-Abhängigkeit, die sich im Bereich von 4.10^9 PBE T_4/Maus als starke Immunosuppression ausdrückt (Abb.8). Die Kurvenform selbst bleibt mehr oder weniger unverändert, so daß man durch eine entsprechend höhere Antigendosis trotz der PHA-Vorbehandlung eine normale Immunreaktion erhalten kann. Der Faktor, um den man dazu die Antigen-Dosis vergrössern muß (etwa 100-fach), stimmt gut mit dem Suppressionsfaktor der PHA-bedingten Suppression des T_4-Überganges aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf überein (Abb.6).

2. Abhängigkeit der Immunreaktion von der Dosis der PHA-Vorbehandlung

Wenn die Immunosuppression durch PHA auf der Drosselung des T_4-Überganges aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf beruht, so sollte man erwarten, daß für sie dieselbe Abhängigkeit sowohl von der Dosis der PHA-Vorbehandlung als auch von der

Zeit zwischen PHA-Injektion und T_4-Injektion besteht, wie für den T_4-Übergang selbst (s.II,1). In Abbildung 1c ist die Abhängigkeit der Immunreaktion von der Dosis der PHA-Vorbehandlung (0,2 ml PHA-Lösung ip, 25 h vor der intraperitonealen Injektion von 0,2 ml T_4-Lösung der Konzentration 2.10^{10} PBE/ml gezeigt. Die drei Kurven zeigen den Neutralisationstiter der Blutproben 3,4 und 6 Tage nach der Injektion des Antigens. Man sieht durch Vergleich mit Abb.1b, daß für die Immunosuppression dieselbe Abhängigkeit von der PHA-Dosis besteht wie für die Suppression des T_4-Überganges.

3. Abhängigkeit der Immunosuppression von der Zeit zwischen PHA- und T_4-Injektion

In Abbildung 10 ist die Abhängigkeit der Immunosuppression von der Zeit zwischen PHA- und Antigen-Injektion gezeigt. Die intraperitoneale PHA-Vorbehandlung (0,2 ml, 1,7 mg PHA/ml) wurde bei den einzelnen Versuchsgruppen (je 10 Tiere) zu verschiedenen Zeiten vor der intraperitonealen Antigen-Injektion durchgeführt. Diese bestand aus 0,2 ml T_4-Lösung der Konzentration 2.10^{10} PBE/ml. Abbildung 10 zeigt, daß auch die Immunosuppression von der Zeit zwischen PHA- und T_4-Injektion abhängig ist. Die stärkste Suppression ergibt sich bei einer PHA-Injektion 30 bis 25 h vor der T_4-Injektion. Außerhalb dieses Zeitintervalls ist die Suppression - gleich wie bei FLV (Abb.2) und beim T_4-Übertritt (Abb.3) - erheblich schwächer. Gibt man PHA und T_4 gleichzeitig, erhält man ebenso wie dort keine Suppression.

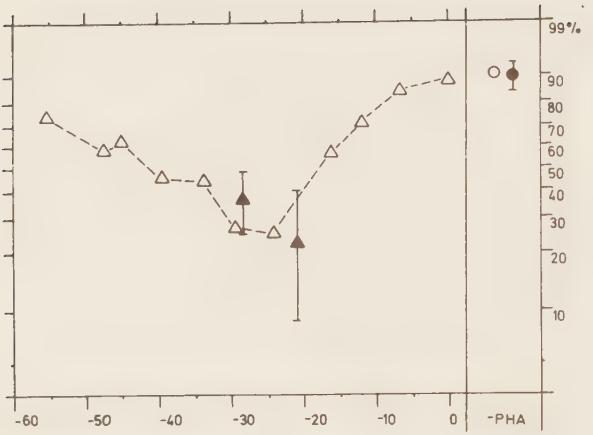


Abbildung 10: Suppression der Immunreaktion gegen intraperitoneal injizierte T_4-Phagen durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit PHA: Abhängigkeit von der Zeit zwischen PHA- und T_4-Injektion(PHA: 0,2 ml ip, 1,7 mg PHA/ml; T_4: 0,2 ml ip, $2 \cdot 10^{10}$ PBE T_4/ml). ● ▲ aus Abbildung 8 übernommene Werte.

DISKUSSION

Man mag gegen die mathematische Behandlung des Virusübertrittes einwenden, mit drei Parametern lasse sich stets eine erste Annäherung an eine gegebene Kurve konstruieren. Ein solcher Einwand ist hier unbegründet, da in diesem Sinne nur ein Parameter frei wählbar ist, die Übertrittskonstante k_3; die beiden anderen, k_1 und k_2, sind dagegen direkt meßbar. Weiter geht die Ableitung der Gleichung für den Virusverlauf im Blut nicht von einem willkürlichen Ansatz aus, sondern von physiologisch einleuchtenden Annahmen, deren Gültigkeit nachgewiesen werden konnte. Die gute Übereinstimmung zwischen berechnetem und gemessenem Verlauf der Viruskonzentration kann damit nur als Zeichen dafür gewertet werden, daß die angewandten Modellvorstellungen den wahren Verhältnissen beim Virusübertritt aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf nahe kommen.

Die mathematische Betrachtungsweise des Virusübertrittes erlaubt, abzuschätzen, welcher Teil des intraperitoneal injizierten Virusmaterials in den Blutkreislauf gelangt. Man muß hierzu den ersten Term der Differentialgleichung (Gl.1), der zeitliche Änderung der Phagenkonzentration im Blut durch Zustrom aus der Bauchhöhle darstellt, über die gesamte Zeit von t=0 bis t=oo integrieren, mit dem Blutvolumen der Maus multi-

plizieren und die für k_1 und k_3 experimentell ermittelten Werte einsetzen. Dividiert man das Ergebnis durch die intraperitoneal injizierte Phagenmenge, so gibt der Quotient, den man erhält, an, welcher Teil des intraperitoneal injizierten Virusmaterials ins Blut gelangt. Diese Rechnung ergibt für den Virusübertritt ohne PHA-Vorbehandlung einen Wert in der Größenordnung von 1; das bedeutet, daß ein großer Teil, wenn nicht das gesamte injizierte Virusmaterial nach und nach in den Blutkreislauf übertritt. Der zeitliche Abfall der Virusmenge in der Bauchhöhle läßt sich nach dieser Berechnung ganz aus dem Übertritt ins Blut erklären.

Dies ist anders nach PHA-Vorbehandlung. Die Elimination der T_4-Phagen aus der Bauchhöhle erfolgt hier etwa doppelt so schnell wie normal (s.Tab.II), der Überstrom ist dagegen um zwei Zehnerpotenzen niedriger. Wir sehen aus dieser Betrachtung, daß eine Erklärung der PHA-Wirkung beim T_4-Übertritt neben der einen Frage, wie der Überstrom gedrosselt wird, auch die andere, worauf in PHA-behandelten Tieren die Elimination des Phagen aus der Bauchhöhle beruht, lösen muß.

Die Drosselung des Übertrittes durch PHA-Vorbehandlung wurde für FLV und für T_4-Phagen gezeigt. Wahrscheinlich gilt sie jedoch allgemeiner, vielleicht sogar für alle Partikel einer bestimmten Größenklasse. Dafür spricht der Vergleich der hier beschriebenen Suppression der Immunreaktion gegen T_4-Phagen mit derjenigen gegen Erythrozyten als Antigen [46,47]. Dieser Vergleich legt nahe, die Suppression der Immunreaktion gegen Erythrozyten (intraperitoneal injiziert) ebenfalls auf die

Drosselung des Übertrittes ins Blut zurückzuführen. Für den Übertritt von Albumin scheint dagegen eine PHA-Vorbehandlung nicht hemmend zu wirken. Ein Versuch, in dem für Mäuse mit und ohne PHA-Vorbehandlung der Verlauf der Konzentration von radioaktiv markiertem Rinderserum-Albumin (RSA) im Blut nach intraperitonealer RSA-Injektion bestimmt wurde, ergab keine nennenswerte Erniedrigung der Albuminkonzentration durch PHA-Vorbehandlung.

Offen ist nach wie vor die Frage, auf welche Art und Weise PHA die Drosselung des Materialübertrittes bewirkt. Partikel treten von der Bauchhöhle durch feine Spalten zwischen den Endothelzellen in die Lymphkapillaren über, die als dichtes Netz die Bauchhöhlenauskleidung und das Mesenterium durchziehen. Über die Lymphgefäße, die eingeschalteten Lymphknoten und den Ductus thoracicus gelangen sie weiter ins Blut[55,56].

Eine Drosselung des Partikelstromes ist an vielen Stellen dieses Weges denkbar; wo PHA angreift, läßt sich noch nicht sagen, da die Wirkung von PHA auf andere als lymphatische Zellen - solche könnten hier durchaus die PHA-Wirkung vermitteln - noch kaum bearbeitet ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Intraperitoneale Vorbehandlung von Mäusen mit Phytohämagglutinin übt auf eine 24 h später folgende Infektion durch intraperitoneal injizierte FRIEND-Leukämieviren eine starke Hemmung aus. Die Wirkung einer intravenösen Injektion von FLV wird nicht beeinträchtigt.

In der gleichen Weise wirkt eine PHA-Vorbehandlung auf die Antikörper-Bildung nach Antigen-Injektion. Diese wird durch die intraperitoneale PHA-Vorbehandlung supprimiert, wenn das Antigen (T_4-Phagen) intraperitoneal, nicht dagegen, wenn es intravenös injiziert wird.

Die Befunde weisen auf eine Störung des Virusübertrittes aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf hin.

Mit T_4-Phagen wurde diese Störung untersucht. Eine mathematische Behandlung der nach intraperitonealer Virusinjektion im Blut erwarteten Viruskonzentration ergab zusammen mit der Messung der Eliminationsrate der Phagen aus der Bauchhöhle bzw. dem Blutkreislauf, daß die Suppression dieser sich im Blut ergebenden Viruskonzentration auf einer Drosselung des Virusstromes von der Bauchhöhle ins Blut beruht.

Die Übereinstimmung der FLV-, Immuno- und T_4-Übertritts-Suppression bezüglich der Abhängigkeit von der PHA-Dosis und der Zeit zwischen PHA- und Virus-Injektion zeigte, daß die Suppression der FLV-Erkrankung und der Immunreaktion gegen T_4-Phagen auf die Drosselung des Virusübertrittes zurückgeht.

Literaturverzeichnis

1 FRIEND, Ch.: Cell-free transmission in adult swiss mice of a diseage having the character of a leukemia. J.Exp.Med. 105, 307; 1956

2 ZEIGEL, R.F., F.J. RAUSCHER: Electron microscopic and bioassey studies on a murine leukemia virus (Rauscher). I. Effects of physicochemical treatments on the morphology and biological activity of the virus. J.Natl.Cancer Inst. 32, 1277; 1964

3 DE-THE, G., T.E. O'CONNOR: The structure of a murine leukemia virus after disruption with Tween-ether and comparison with two myxoviruses. Virol. 28, 713; 1966

4 PADGETT, F., A.S. LEVINE: Fine structure of the Rauscher leukemia virus as revealed by incubation in snake venom. Virol. 30, 623; 1966

5 DUESBERG, P.H., W.S. ROBINSON: Nucleic acid and proteins isolated from the Rauscher mouse leukemia virus (MLV). Proc.N.A.S. 55, 219; 1966

6 RAUSCHER, F.J.: A virus induced disease of mice characterized by erythrocytopoiesis and lymphoid leukemia. J.Natl.Cancer Inst. 29, 515; 1962

7 GROSS, L.: "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with Ak-leukemic extracts, or Ak-embryos. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 76, 27; 1951

8 MOLONEY, J.B.: Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. J.Natl.Cancer Inst. 24, 933; 1960

9 PLUZNIK, D.H., L. SACHS: Quantitation of a murine leukemia virus with a spleen colony assay. J.Natl.Cancer Inst. 33, 535; 1964

10 AXELRAD, A.A., R.A. STEEVES: Assay for Friend leukemia virus: rapid quantitative method based on enumeration of macroscopic spleen foci in mice. Virol. 24, 513; 1964

11 METCALF, D., J. FURTH, R.F. BUFFETT: Pathogenesis of mouse leukemia caused by Friend virus. Canc.Res. 19, 52; 1959

12 RIGAS, D.A., E.E. OSGOOD: Purification and properties of the phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris. J.Biol.Chem. 212, 607; 1955

13 TAKAHASHI, T., P. RAMACHANDRAMURTHY, I.E. LIENER: Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from Phaseolus vulgaris. Bioch.Bioph.Acta 133, 123; 1967

14 BOYD, W.C.: The Lectins: Their present status. Vox Sang. 8, 1; 1963

15 LI, J.G., E.E. OSGOOD: A method for the rapid separation of leucocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with a phytohemagglutinin from red beens (Phaseolus vulgaris). Blood 4, 670; 1949

16 NOWELL, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Canc.Res. 20, 462; 1960

17 ELVES, M.W., J.F. WILKINSON: Effects of phytohaemagglutinin on the morphology of cultured leucocytes. Nat. 194, 1257; 1962

18 TANAKA, Y., L.B. EPSTEIN, G. BECHER, F. STOHLMAN jr.: Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood. Blood 22, 614; 1963

19. SABESIN, S.M.: Blastoid transformation of rabbit and guinea pig peripheral lymphocytes by phytohemagglutinin. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 122, 351; 1966

20 HUNGERFORD, D.A., A.J. DONELLY, P.C. HOWELL, S. BECK: The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. Amer.J.Human Genetics 11, 215; 1959

21 ROBBINS, J.H.: Tissue culture studies of the human lymphocyte. Science 146, 1648; 1964

22 BENDER, M.A., D.M. PRESCOTT: DNA synthesis and mitosis in cultures of human peripheral leukocytes. Exp.Cell Res. 27, 221; 1962

23 MARSHALL, W.H., K.B. ROBERTS: The growth and mitosis of human small lymphocytes after incubation with a phytohemagglutinin. Quart.J.Exptl.Physiol. 48, 146; 1963

24 YOFFEY, J.M., G.C.B. WHITER, D.G. OSMOND, E.S. MEEK: Morphological studies in the culture of human leukocytes with phytohemagglutinin. Brit.J.Haemat. 11, 488; 1965

25. SALZMAN, N.P., M. PELLEGRINO, P. FRANCESCHINI: Biochemical changes in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. Exp.Cell.Res. 44, 73; 1966

26 GOWANS, J.L., D.D. McGREGOR: The immunological activities of lymphocytes. in Progress in Allergy 9, S. Karger Basel, New York 1965

27 McINTYRE, O.R., F.G. EBAUGH jr.: The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P^{32} incorporation in the DNA, RNA and acid soluble fractions. Blood 19, 443; 1962

28 EPSTEIN, L.B., F. STOHLMAN, jr.: RNA synthesis in cultures of normal human peripheral blood. Blood 24, 69; 1964

29 RUBIN, A.D., H.L. COOPER: Evolving patterns of RNA metabolism during transition from resting stage to active growth in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. Proc.N.A.S. 54, 469; 1965

30 COOPER, H.L.: Ribonucleic acid metabolism in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. II. Rapidly synthesized ribonucleic acid and the production of ribosomal ribonucleic acid. J.Biol.Chem. 243, 34; 1968

31 LUCAS, Z.J.: Pyrimidine nucleotide synthesis: regulatory control during transformation of lymphocytes in vitro. Science 156, 1237; 1967

32 HAUSEN, P., H. STEIN: On the synthesis of RNA in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin.I. Induction of Uridine-kinase and the conversion of uridine to UTP. Europ.J.Bioch. im Druck

33 POGO, B.G.T., V.G. ALLFREY, A.E. MIRSKY: RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. Proc.N.A.S. 55, 805; 1966

34 COOPER, E.H., P. BARKHAN, A.J. HALE: Observations on the proliferation of human leukocytes cultured with phytohemagglutinin.
Brit.J.Haemat. 9, 101; 1963

35 BACH, F., K. HIRSCHHORN: γ-globulin production by human lymphocytes in vitro.
Exp.Cell.Res. 32, 592; 1963

36 COOPERBAND, S.R., H. BONDEVIK, K. SCHMID, J.A. MANNICK: Transformation of human lymphocytes: inhibition by homologous alpha-globulin.
Science 159, 1243; 1968

37 PEARMAIN, G., R.R. LYCETTE, P.H. FITZGERALD: Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leukocytes.
Lancet 1, 637; 1963

38 ELVES, L.W., S. ROATH, M.C.G. ISRAELS: The response by lymphocytes to antigen challenge in vitro.
Lancet 1, 806; 1963

39 ELROD, L.M., R. SCHREK: Production of lymphoblastoid cells from rat and human lymphocytes by rabbit serum and phytohemagglutinin.
Exp.Cell Res. 38, 418; 1965

40 BECKMAN, L.: Effect of phytohaemagglutinin on human serum and cell proteins.
Nature 195, 582; 1962

41 GRÄSBECK, R.C. NORDMAN, A. de la CHAPELLE: Mitogenetic action of anti-leukocyte immune serum on peripheral leukocytes in vitro.
Lancet 2, 385; 1963

42 GRÄSBECK, R., C.T. NORDMAN, A. de la CHAPELLE: The leukocyte-mitogenic effect of serum from rabbits immunized with human leukocytes.
Acta Med.Scand. Suppl.412, 39; 1964

43 NORDMAN, C.T., A. de la CHAPELLE, R. GRÄSBECK: The interrelations of erythroagglutinating, leukoagglutinating, and leukocyte-mitogenic activities in Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin.
Acta Med.Scand. Suppl.412, 49; 1964

44 KOLODNY, R.L., K. HIRSCHHORN: Properties of phytohemagglutinin.
Nature 201, 715; 1964

45 RIVERA, A., jr., G.C. MUELLER: Differentiation of the biological activities of phytohemagglutinin affecting leukocytes.
Nature 212, 1207; 1966

46 SIMS, F.H., J.W. FREEMAN: The depression of the immune response by serum protein fractions.
Immunology 11, 175; 1966

47 MOWBRAY, J.F., D.C. HARGRAVE: Further studies on the preparation of the immunosuppressive alpha 2 protein fraction from serum and its assay in mice.
Immunology 11, 413; 1966

48 KIND, L.S., W.A. PETERSEN: Concanavalin A in vivo: induction of hemorrhagic skin lesions (Arthus-like reactions) in mice.
Science 160, 312; 1968

49 GAMBLE, C.N.: The effects of phytohemagglutinin on mouse spleen cells in vivo.
Blood 28, 175; 1966

50 GAMBLE, C.N.: The effect of phytohemagglutinin on the primary antibody response of mice to rat erythrocytes and human gamma globulin.
Int.Arch.Allergy 29, 470; 1966

51 ELVES, M.W.: Suppression of antibody production by phytohaemagglutinin.
Nature 213, 495; 1967

52 SPREAFICO, F., E.M. LERNER: Suppression of the primary and secondary immune response of the mouse by ph tohaemagglutinin.
J.Immunol. 98, 407; 1967

53 ADAMS, M.H.: Bacteriophages,
Interscience Publ., New York 1959

54 KOHLRAUSCH, F.: Praktische Physik, Bd.1
Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig 1955

55 STRACK, E.: Biochemie der Resorption,
in: Physiologische Chemie, Bd. II, 1a
Springer 1954

56 RUCH-PATTON, Physiology and Biophysics,
Saunders 1965

Lebenslauf

Am 2. April 1940 wurde ich als Sohn des Staatsanwalts Otto Scherer und seiner Frau Luise, geb. Bezler, in Kaiserslautern geboren.

In Tübingen besuchte ich von 1946-1950 die Volksschule, danach das humanistische Gymnasium. Im Frühjahr 1959 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

An den Universitäten Tübingen, Saarbrücken und Lausanne studierte ich anschließend Physik, bis ich 1962 zur Biologie überwechselte.

Im August 1964 begann ich am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, unter der Anleitung von Professor Dr. H.Friedrich-Freksa meine Doktorarbeit. Die Dissertation "Einfluß von Phytohämagglutinin auf den Virusübertritt aus der Bauchhöhle in den Blutkreislauf" wurde im Frühjahr 1968 abgeschlossen.

Meine akademischen Lehrer waren:

Dr. E. Bünning	Dr. K. Mägdefrau
Dr. A. Egelhaaf	Dr. A.W. Maue
Dr. H. Friedrich-Freksa	Dr. F.P.Möhres
Dr. A. Gierer	Dr. G. Möllenstedt
Dr. K.G. Grell	Dr. M.D. Rivier
Dr. F.R. Keßler	Dr. V. Schwartz
Dr. H. Krüger	Dr. H.G. Wittmann.

aku 86 BAMBERG, Schiffbauplatz 4b, Tel. (0951) 2 27 78
Fotodruck und Verlag wissenschaftlicher Publikationen